

# BEST AVAILABLE COPY

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 628 838**  
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **89 03593**

⑤1 Int Cl<sup>4</sup> : G 01 N 21/66, 33/53.

## ⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 20 mars 1989.

③0 Priorité : SE, 21 mars 1988, n° 8801011-1.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 38 du 22 septembre 1989.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : KANKARE Jouko Juhani et HAAPAKKA Keijo Ensio. — FI.

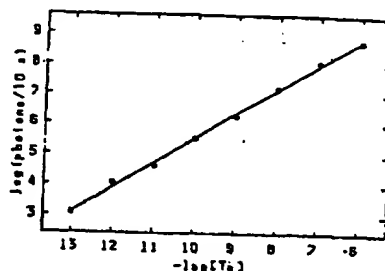
⑦2 Inventeur(s) : Jouko Juhani Kankare; Keijo Ensio Haapakka.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Pierre Loyer.

⑤4 Luminescence produite électriquement en solution.

⑤7 Un procédé par lequel la présence et/ou la quantité d'une partie chimique contenant du terbium ou de l'europium est déterminée en appliquant une impulsion électrique à une électrode immergée dans une solution et en mesurant le retard de la lumière émise un certain temps après la fin de l'impulsion, ladite partie chimique étant liée à ladite électrode, et/ou présente dans ladite solution et ladite lumière émise étant prise comme une indication de la quantité de la partie chimique présente à proximité de ladite électrode.



FR 2 628 838 - A1

Luminescence produite électriquement en solution

L'invention concerne le procédé par lequel un composé  
5 luminescent dans une solution aqueuse ou non aqueuse est  
excité par une impulsion électrique soit directement par  
un transfert d'électrons depuis une électrode soit  
indirectement par une réaction intermédiaire induite  
électrochimiquement. L'émission de lumière depuis le  
10 composé est détectée après la fin de l'impulsion  
d'excitation.

Le nouveau procédé peut trouver des applications dans  
ces champs où une limite très basse de détection est  
nécessaire, par exemple, dans les procédés analytiques  
15 basés sur les essais de liaison comme les immunoessais et  
les essais d'hybridation d'acide nucléique.

Les procédés analytiques basés sur la luminescence  
dans ses modifications diverses sont généralement connus  
pour leur sensibilité, mais présentent leurs défauts à des  
20 concentrations très basses des substances émettrices. La  
sensibilité de fluorescence est limitée par le phénomène  
de diffusion de Rayleigh et Raman de même que par les  
impuretés fluorescentes qui accroissent l'émission  
d'arrière-plan non spécifiques. La phosphorescence est  
25 principalement restreinte à l'état solide et l'émission de  
ce petit nombre de composés qui ont une phosphorescence en  
solution à température ambiante est en général extrêmement  
sensible à l'oxygène, ce qui entrave leurs applications  
pratiques. La fluorescence différée de chélates  
30 lanthanidiques a été utilisée comme base de procédé d'un  
immunoessai, et ne permet qu'une limite de détection très  
basse. Les procédés basés sur la fluorescence et la  
phosphorescence conventionnelles utilisent une excitation  
par la lumière et nécessitent une source de lumière et  
35 des moyens optiques appropriés. Les procédés basés sur la  
chimiluminescence (CL) n'ont pas besoin de moyens

optiques d'excitation et les instruments sont en général très simples. Cependant, les procédés CL sont souvent soumis à une interaction chimique grave.

Le procédé proposé dans cette invention élimine  
5 certains défauts d'autres procédés basés sur la luminescence. Aucun instrument optique d'excitation n'est utilisé et l'instrument électronique requis pour l'excitation par impulsion par courant électrique peut être de fabrication très simple. L'essence de l'invention  
10 est que l'émission d'arrière-plan non spécifique est totalement éliminée en utilisant des composés luminescents appropriés à luminescence de longue durée et en mesurant l'émission de lumière un certain temps après la fin de l'impulsion d'excitation.

15 La chimioluminescence (ECL) produite électriquement est connue depuis longtemps. Son utilisation dans les immunoessais a été proposée par Bard et autres (D.Ege, W Becker et A. Bard, Anal. Chem.56 (1984) 2413, pct Int. Appl. WO 86/02734). Ils proposent d'utiliser des composés  
20 contenant du ruthenium ou de l'osmium comme indicateurs dans les essais de liaison. Du platine et du carbone vitrifié sont utilisés comme matériau pour l'électrode de travail dans l'exemple donné, et l'émission de lumière depuis l'électrode est mesurée durant l'impulsion de  
25 tension.

Comme il a été représenté par les présents auteurs, une luminescence produite électriquement est produite à des électrodes d'alumine ou de tantale recouvertes d'oxyde par de nombreux ions inorganiques (K. Haapakka et autres,  
30 Anal. Chim. Acta 171 (1985) 259) et par des composés organiques fluorescents (K. Haapakka et autres, Anal. Chim. Acta 207 (1988) 195) en présence d'agents oxydants adéquats. Dans ces études l'émission de lumière depuis les électrodes était mesurée également durant l'impulsion de  
35 tension appliquée aux électrodes.

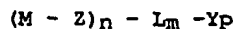
Il serait très avantageux d'obtenir un procédé qui utilise des électrodes bon marché, de préférence jetables et des composés à luminescence de longue durée qui soient relativement exempts d'interactions. Un tel procédé serait  
5 utilisé par exemple dans des essais de liaison tels que des immunoessais homogènes et hétérogènes permettant l'utilisation d'instruments plutôt simples et bon marché. Dans les immunoessais ou plus généralement dans les essais de liaison deux composants réagissent de manière  
10 spécifique entre eux et le produit est quantifié par un procédé approprié, hautement sensible. S'il est nécessaire de séparer le produit avant sa détermination, le procédé est dit hétérogène, et homogène si aucune phase de séparation n'est nécessaire. En raison de leur procédure  
15 plus simple, les essais homogènes sont préférables, mais jusqu'à présent les essais hétérogènes ont fourni des limites de détection plus basses. De façon typique, dans ces procédés, la présence d'un composé est indiquée en le marquant d'une partie chimique qui peut être déterminée  
20 avec une haute sensibilité, par exemple un isotope radioactif, un enzyme, un composé fluorescent, etc. Il est particulièrement avantageux de faire un marquage avec un composé fluorescent qui a une chute d'émission basse de l'état d'excitation. La plupart des échantillons soumis  
25 aux immunoessais contiennent une substance fluorescente naturelle qui accroît l'émission d'arrière-plan et par suite affecte la limite de détection dans la détermination fluorométrique conventionnelle. Des chélates d'euporium et de terbium présentent une durée de vie de leur émission de  
30 fluorescence dans le domaine des millisecondes, c'est-à-dire de plusieurs ordres de grandeur plus longue que la fluorescence "naturelle" des composés organiques d'origine biologique.

Un essai homogène basé sur la luminescence est  
35 possible si le complexe anticorps-antigène absorbé à la surface peut être excité de façon sélective sans

excitation de composé marqué dans la solution. Ceci a été précédemment réalisé (U.S. Pat. 3 939 350 (1976)) en utilisant des antigènes marqués liés à des anticorps reliés à un curseur en quartz. L'échantillon est excité depuis un autre côté du curseur, avec le rayon en réflexion totale depuis la surface du curseur. Dans la mesure seule la fraction liée à la phase solide est excitée, évitant ainsi la phase de séparation. Le procédé impose des exigences de qualité optique stricte sur le curseur d'échantillon et en conséquence son utilisation dans des essais de routine est restreint. De même la diffusion et la fluorescence d'arrière-plan restent de sérieux problèmes. De manière préférable une excitation des composés luminescents sur la surface ou sa proximité immédiate peut être techniquement plus facilement réalisée en utilisant une luminescence produite électriquement et l'influence d'une fluorescence d'arrière-plan peut être minimisée en utilisant des marquages à électroluminescence retardée.

L'invention concerne un procédé pour déterminer la présence et/ou la quantité d'une partie chimique contenant du terbium ou de l'euprium en appliquant une impulsion électrique à une électrode immergée dans une solution contenant ladite partie chimique en solution et/ou absorbée à la surface de l'électrode, et en mesurant la persistance de l'émission de lumière après la fin de l'impulsion. L'émission de lumière mesurée est prise comme indication de la quantité de partie chimique présente à proximité de l'électrode. Le phénomène à mesurer sera appelé ici électroluminescence retardée ou DEL en agrégé.

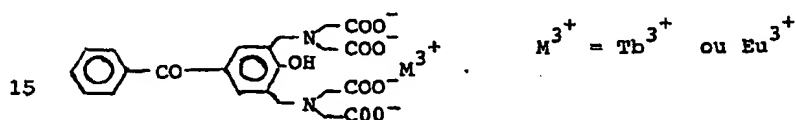
Ladite partie chimique peut avoir une structure générale



dans laquelle M est du terbium ou de l'euprium, n est un nombre entier supérieur ou égal à un, m et p des

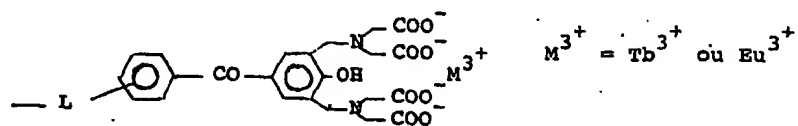
nombres entiers égaux ou supérieurs à zéro, Z est un  
 coordinat polydentate, L est un groupe de liaison et Y est  
 une substance qui sera décrite plus tard. Z, L, et Y sont  
 d'une composition telle que la partie chimique peut être  
 amenée à émettre de la lumière en la soumettant aux  
 conditions requises par l'électroluminescence retardée.

Dans le cas le plus simple m et p sont tous les deux  
 égaux à zéro et n est égal à un. Dans ce cas M-Z est un  
 chélate de terbium ou d'euprium. Une structure préférée  
 de Z est



Le procédé peut être utilisé par exemple pour la  
 détermination hautement sensible de terbium comme il sera  
 décrit dans l'exemple I. Dans un cas plus compliqué  $n, m \geq 1$   
 et  $p \geq 1$ . Les substances Y sont alors dites marquées par une  
 marque DEL. Des substances adéquates Y comprennent de  
 nombreuses substances biologiques, par exemple, une  
 cellule entière une particule subcellulaire, un virus,  
 un acide nucléique, un nucléotide, un oligonucléotide, un  
 polynucléotide, un polysaccharide, une protéine, un  
 polypeptide, un enzyme, un métabolite cellulaire, une  
 hormone, un agent pharmacologique, un alcaloïde, un  
 stéroïde, une vitamine, un acide aminé ou un hydrate de  
 carbone, un anticorps dérivé de sérum ou monoclonal. Dans  
 le champ de cette invention, on inclut aussi des  
 substances synthétiques, comme des médicaments, des acides  
 nucléiques synthétiques et des polypeptides synthétiques.  
 La substance Y est liée à travers des groupes de liaison L  
 aux chélates M-Z. Les groupes de liaison peuvent être ces

radicaux bivalents utilisés généralement pour marquer les molécules d'analyte de molécules d'essai bien connues par les hommes de l'Art. Ces groupes de liaison bivalents comprennent un ureido, thioureido, un amide, tel que -CONH-, -CONMe- ; un thioether, tel que -S-, -S-S- ; un sulfonamide, tel que -SO<sub>2</sub>NH-, -SO<sub>2</sub>NMe ; le groupe de liaison L peut aussi contenir une chaîne moléculaire de composition et de longueur variable appelée espaceur. Cet espaceur est utilisé pour garder la partie de chelate et la substance Y à une distance adéquate l'une de l'autre et il peut présenter les groupes de liaison ci-dessus mentionnés comme groupes latéraux. Une partie de ces groupes latéraux est liée aux coordinats de polydentate Z, une autre aux substances Y. Les coordinats de polydentate Z peuvent être un composé aromatique présentant des groupes latéraux qui chelatent tels que -CH<sub>2</sub>N<CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>. Voici une structure préférée du chelate :



L'invention peut être utilisée pour déterminer des parties marquées d'intérêt, pour utiliser des parties marquées pour déterminer des analytes d'intérêt, ou pour utiliser des analogues marqués d'analytes d'intérêt pour déterminer des analytes d'intérêt à la fois dans des essais de liaison compétitifs et non compétitifs. Ces essais de liaison peuvent être hétérogènes ou homogènes. Des essais de liaison analogues sont aussi utilisés dans des techniques d'hybridation d'acide nucléique, où les marquages DEL peuvent aussi trouver leur utilisation,

2628838

7

comme les essais d'hybridation en sandwich et en point et tache de même que les essais d'hybridation utilisant une collection basée sur l'affinité et une technologie PCR (réaction en chaîne polymérase)

5 Par exemple, dans un immunoessai compétitif l'anticorps est enrobé sur la surface de l'électrode et l'antigène est en concurrence avec un marquage DEL pour les emplacements actifs de l'anticorps. L'antigène correspond maintenant à la substance Y et peut appartenir  
10 à un des types décrits précédemment. La quantité de complexe anticorps-antigène sur la surface de l'électrode est quantifiée par DEL soit directement après immunoréaction soit après une phase de lavage et addition d'une solution d'électrolyte adéquate contenant par  
15 exemple du peroxydisulfate. De façon alternative un immunoessai homogène non compétitif peut être réalisé en immobilisant un anticorps "en prise" à la surface de l'électrode. Les antigènes d'échantillon pris par ces anticorps sont quantifiés avec l'utilisation d'anticorps  
20 marqués par DEL qui se lient à un second emplacement de l'antigène. Dans ce cas les antigènes peuvent être des substances énumérées précédemment en liaison avec la définition de Y.

Le système de mesure est composé d'un générateur à  
25 impulsion, un potentiomètre, une cellule d'échantillon avec deux ou trois électrodes, un filtre à lumière optionnel ou monochromatique, un détecteur de lumière, un intégrateur à déclenchement ou compteur de photon. Le générateur à impulsion peut être un générateur capable de  
30 produire des chaînes d'impulsions librement programmables avec une amplitude réglable.

Le potentiomètre peut être un potentiomètre conventionnel à trois électrodes, ou, si seulement deux électrodes sont utilisées, un simple amplificateur de  
35 récupération capable de produire quelques dizaines de milliampères de courant.



La cellule d'échantillon et le détecteur de lumière sont enfermés dans la même chambre étanche à la lumière. La cellule a deux ou trois électrodes immergées dans la solution d'électrolyte. Dans le cas de trois électrodes

5 une électrode est une électrode de référence, une autre est une électrode auxiliaire, et une autre une électrode de travail. Celles-ci sont reliées au potentiomètre de la manière conventionnelle. L'émission de lumière est mesurée à partir de l'électrode de travail, qui est faite en un

10 quelconque matériau conducteur. Le matériau préféré est un métal recouvert d'oxyde, par exemple, de l'alumine, du tantale, du zirconium ou de l'hafnium. L'électrode de référence peut être une quelconque électrode de référence conventionnelle, par exemple une électrode calomel ou une

15 électrode Ag-AgCl. L'électrode auxiliaire peut être d'un matériau conducteur quelconque, le plus souvent de platine. Si deux électrodes seulement sont utilisées, les électrodes peuvent être toutes les deux du même matériau, par exemple de l'alumine, dans lequel cas, la lumière peut

20 être émise depuis les deux électrodes ou l'autre électrode est d'un matériau différent. De façon alternative la coupelle d'échantillon peut être elle-même d'alumine et elle fonctionne dans ce cas comme l'électrode de travail depuis laquelle la lumière est émise.

25 L'intensité de lumière depuis l'électrode de travail est mesurée en utilisant un photomultiplicateur ou une photodiode avec un filtre optionnel ou monochromatique entre, et le signal électrique depuis le détecteur de lumière est amené à un intégrateur à déclenchement ou un

30 compteur de photon à déclenchement. Le déclenchement est synchronisé avec les impulsions depuis le générateur d'impulsions avec un retard approprié.

L'échantillon à mesurer pour sa DEL est un composé qui est dissous dans une solution ou absorbé à la surface

35 de l'électrode de travail. Le composé doit avoir une chute lente de son électroluminescence. Les composés préférés

sont des complexes de lanthanide luminescent, de préférence tels que des chélates de Tb  $3^+$  ou Eu  $3^+$ , qui ont une chute à l'échelle des millisecondes. Le composé peut être mesuré lui-même ou peut être lié comme un marquage au matériau d'essai. En plus du composé à mesurer, la solution d'électrolyte dans la cellule d'échantillon contient de l'électrolyte, de préférence du sulfate ou de l'acétate pour accroître la conductivité. Un composé oxydant, tel que le peroxydisulfate, le peroxyde d'hydrogène ou de l'oxygène dissous, peut être présent dans la solution. La fonction de l'agent oxydant est de produire des radicaux hautement réactifs par une réduction électrolytique directe ou intermédiaire, par exemple,  $S_2O_8^{2-} + e^- \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\cdot -}$

Ces radicaux réagissent avec le composé luminescent produisant une émission de lumière. En conséquence l'électroluminescence est observée après une impulsion cathodique à l'électrode de travail. Des impulsions anodiques de tension peuvent être utilisées pour certains types de composés de lanthanide.

Une succession d'impulsions cathodiques d'une durée adéquate et d'un cycle opératoire dépendant du composé luminescent est appliquée à l'électrode de travail. L'émission de lumière résultante est mesurée après la fin des impulsions cathodiques en utilisant un retard et une largeur de déclenchement appropriés. Pour les complexes de terbium préférés la longueur de l'impulsion cathodique peut varier de 0,2 ms à 5ms, le délai après l'impulsion étant de 0,1 à 0,5 ms et la largeur du déclenchement de 2 ms à 10 ms. Pour les complexes d'euprimum les temps sont d'environ 4 fois plus courts. Le signal intégré durant le temps d'ouverture du déclenchement représente en moyenne autant de périodes qu'il est nécessaire pour réaliser le rapport requis signal-bruit.

35

EXEMPLE 1Courbe standard pour le terbium par électroluminescence

5 La solution d'échantillon dans l'exemple est 0,3 M dans du sulfate de sodium, 0,001 M dans du peroxydisulfate de potassium et  $10^{-5}$  M dans un 3,6 -bis-(N, N-bis (carboxyméthyl) aminométhyl)-4-benzoylphénol, et ajusté au  
10 pH 11,2 avec  $5 \times 10^{-4}$  M TRIS et NaOH. Les mesures de DEL sont faites dans des coupelles jetables en feuille d'alumine de 0,3 mm d'épaisseur et de 99,9 % de pureté. L'autre électrode est un fil court de platine. Des parties croissantes de chlorure de terbium sont ajoutées et la  
15 persistance de l'électroluminescence était mesurée en utilisant des impulsions cathodiques de 1 ms de durée, de 8,5 V d'amplitude et de 4 % pour cycle d'opération. La lumière émise depuis la coupelle d'alumine était détectée par un photomultiplicateur et un compteur de photon à deux  
20 canaux (Stanford Research, Model SR 400). Le déclenchement d'un canal était ouvert de 0,2 à 10 ms depuis la fin de l'impulsion cathodique et l'autre canal comptait les photons à "courant noir" depuis 10,2 à 20 ms. Après une  
25 durée de comptage de 100 s les contenus des deux registres à compteur étaient soustraits l'un de l'autre. La table 1 et la figure 1 indiquent les résultats.

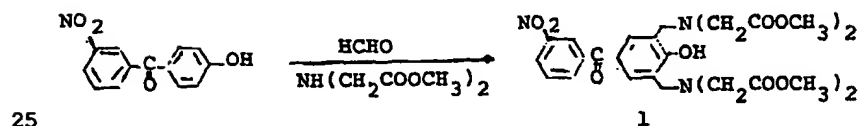
TABLE 1

| Terbium mol/L | Photons/100 s |
|---------------|---------------|
|---------------|---------------|

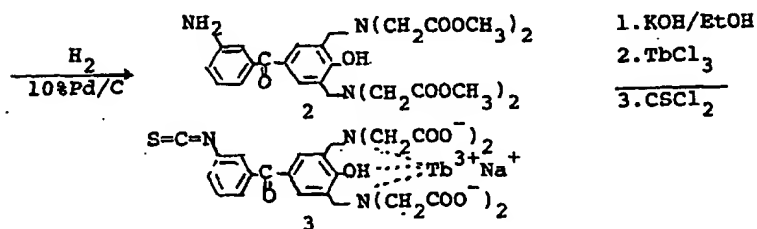
|    |                   |             |
|----|-------------------|-------------|
| 5  | 10 <sup>-13</sup> | 1.200       |
|    | 10 <sup>-12</sup> | 11.000      |
|    | 10 <sup>-11</sup> | 40.800      |
|    | 10 <sup>-10</sup> | 316.000     |
|    | 10 <sup>-9</sup>  | 1.750.000   |
| 10 | 10 <sup>-8</sup>  | 15.824.000  |
|    | 10 <sup>-7</sup>  | 112.000.000 |
|    | 10 <sup>-6</sup>  | 565.000.000 |
|    |                   |             |
| 15 | EXEMPLE II        |             |

Préparation d'un composé de marquage

20



25



Synthèse de 4-(3-nitrobenzoyl)-2,6-bis [N,N-bis (méthoxy-carbonylméthyl) aminométhyl] phenol (1)

5

A une solution de 37 % de formaldéhyde aqueux (0,81 g, 10 mmol) dans du méthanol (20 mL) était ajouté un iminoacétate diméthylque (1,61 g, 10 mmol). La solution était concentrée sous vide. Une autre partie de méthanol  
10 (25 mL) était ajoutée au résidu et la solution était concentrée sous vide. Au résidu était ajouté du 4-hydroxy-3'-nitrobenzophenone (1,22 g 5 mmol), et le mélange était chauffé en remuant à 110°C pendant 20 h. Le produit était purifié par chromatographie sur du gel de silice en  
15 utilisant le chloroforme comme éluant. La production d'huile jaunâtre était de 1,76 g (60%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 3,48 (1H, s), 3,58 (8H,s), 3,71 (12H, s), 4,08 (4H,s), 7,73 (2H,s), 7,56-8.58 (4H,m).

20 Synthèse de 4-(3-aminobenzoyl)-2,6-bis [N,N-bis (methoxy-carbonylméthyl) aminométhyl]phenol (2)

Un composé 1 (0,89 g, 1,5 mmol) était agité pendant 1 heure dans du méthanol (50 mL) avec 10 % Pd/C (90mg) sous  
25 une pression d'hydrogène de 50 psi. Le mélange était filtré et évaporé sous vide. Le produit était purifié par chromatographie sur du gel de silice en utilisant du pétrole léger (b.p 50-70 °C)/acétate d'éthyle (2:5) comme éluant. La production d'huile jaunâtre était de 0,40 g  
30 (48%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) : k 3,56 (1H, s), 3,59 (8H,s), 3,71 (12H, s), 4,01 (6H, broad s), 7,05-7,14 (4H, m), 7,70 (2H,s).

35 Synthèse d'un complexe de terbium de 4-(3-isothio-cyanatobenzoyl)-2, 6-bis [N,N-bis (carboxyméthyl) aminométhyl] phenol (3)

Le composé 2 (0,40g, 0,71 mmol) était agité pendant 3 heures dans 0,5 M KOH-éthanol (20 mL) et dans de l'eau (5mL). La solution était neutralisée avec 1 M HCl et évaporée sous vide. De l'eau (15 mL) et du chlorure de terbium étaient ajoutés, le pH était ajusté à 8,0 et la solution était filtrée. Quelques millilitres d'acétone étaient ajoutés au filtrat, et le complexe de terbium était filtré. Une petite partie du complexe (68 mg) dans de l'eau (3 mL) était ajoutée en gouttes dans une solution de thiophosgène (31  $\mu$ L, 0,4 mmol) et NaHCO<sub>3</sub> (42 mg, 0,5 mmol) dans CHCl<sub>3</sub>. Après rajout de quelques millilitres d'acétone le précipité était filtré et purifié par chromatographie sur du gel de silice en utilisant CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (4:1) comme éluant. La production était de 1,5 mg (38 % ; basé sur 2).

#### EXEMPLE III

Immunoessai en sandwich hétérogène de phospholipase A2 pancréatique humain.

Marquage d'antiserum PLA2 mouton-anti-humain :

4 - (3-Isothiocyanatobenzoyl) - 2,6 bis [N,Nbis (carboxyméthyl) -aminométhyl] complexe de terbium phenol (3, exemple II) était utilisé pour réagir avec un excès molaire de 60, avec l'anticorps au pH 9,5 durant une nuit. L'anticorps marqué était séparé du complexe de terbium libre en excès sur une colonne remplie de Sephadex G-50 (1x5,5 cm) et de Sepharose 6 B (1x5,2 cm) en utilisant 0,1 M de tampon de carbonate de sodium pH 9,3, contenant 9 g/L de NaCl et 0,05 % NaN<sub>3</sub> comme agent éluant.

# Revêtement des coupelles d'alumine :

Les coupelles d'alumine (faites de 99,9% de feuille d'alumine de 0,3 mm d'épaisseur) étaient revêtues d'antiserum anti-humain PLA<sub>2</sub> par absorption physique dans  
 5 0,05 M Tris-HCl tampon, pH 7,5, contenant 9 g/L de NaCl et 0,05% NaN<sub>3</sub> (TSA-tampon) pendant une nuit à température ambiante. Après le revêtement les coupelles sont lavées avec une solution (NaCl 9g/L, NaN<sub>3</sub> 0,01% et Tween 20 0,2 g/L) et saturées avec 0,01% d'albumine de serum bovin  
 10 (BSA) pendant une nuit et stockées humides à +4°C.

# Immunoessai :

Les coupes d'alumine étaient lavées une fois avec 500 µL de solution. Puis 25 µL de standards contenant 0,9, 54  
 15 et 324 ng/mL de phospholipase A2 dans un tampon-TSA (0,1% BSA) étaient ajoutés aux coupelles ainsi que 175 µL d'anticorps Tb-marqué anti-PLA<sub>2</sub> (570ng/mL) dans un tampon 0,05 M Tris -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.8, contenant BSA 5 g/L, NaN<sub>3</sub> 0,5 g/L. Après incubation pendant 3 heures en secouant  
 20 continuellement les coupelles étaient lavées 6 fois avec la solution. L'électroluminescence était mesurée dans les coupelles après rajout de 450 µL de tampon 0,001 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,7, contenant 0,3 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 0,001 mol/L K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, comme dans l'exemple I hormis que le temps de  
 25 comptage était seulement de 3 s. Les résultats de l'essai sont représentés à la Table 2 et à la figure 2.

TABLE 2

| 30 | PLA <sub>2</sub> ng/mL | Photons/10 <sup>5</sup> /3s |      |
|----|------------------------|-----------------------------|------|
|    |                        |                             |      |
|    | 0                      | 1,9                         | 1,7  |
|    | 9                      | 3,0                         | 2,4  |
|    | 54                     | 6,5                         | 5,9  |
| 35 | 324                    | 18,6                        | 24,5 |

EXAMPLE IV

5

Immunoessai en sandwich homogène de PLA2 pancréatique humain en sérum

10 Le revêtement des coupelles et le marquage de l'antisérum PLA2 mouton-anti-humain sont réalisés comme dans l'exemple III.

## Immunoessai :

15 Les coupelles d'alumine étaient lavées une fois avec 500 µL de solution. Puis 25 µL de standards contenant 0,9, 54 et 324 ng/mL de phospholipase A2 dans du sérum humain étaient ajoutés aux coupelles ainsi que 425 µL d'anticorps Tb-marqué anti-PLA2 (235ng/mL) dans un tampon 0,05 M Tris -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.7 contenant BSA 5 g/L, NaN<sub>3</sub> 0,5 g/L, 0,3  
 20 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,001 mol/L K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Après incubation pendant 3 heures en secouant continuellement, l'électroluminescence était mesurée directement dans les coupelles comme dans l'exemple I hormis que le temps de comptage était seulement de 3 s. Les résultats de l'essai  
 25 sont représentés à la Table 3 et à la figure 3.

TABLE 3

| PLA2 | ng/mL | Photons/10 <sup>5</sup> /3s |      |
|------|-------|-----------------------------|------|
| 0    |       | 1,6                         | 1,5  |
| 9    |       | 1,8                         | 2,1  |
| 54   |       | 3,1                         | 3,7  |
| 324  |       | 9,1                         | 10,4 |

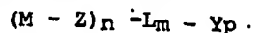
35



REVENDICATIONS

1. Un procédé par lequel la présence et/ou une  
5 quantité d'une partie chimique contenant du terbium ou de  
l'euporium est déterminée par application d'une impulsion  
électrique dans une électrode immergée dans une solution et  
en mesurant la persistance de l'émission de lumière une  
fois constatée la fin de l'impulsion, ladite partie  
10 chimique étant liée à ladite électrode et/ou présente dans  
ladite solution et ladite lumière émise étant prise comme  
une indication de la quantité de partie chimique présente à  
proximité de cette électrode.

2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en  
15 ce que ladite partie chimique présente la formule :



dans laquelle :

M est du terbium ou de l'euporium

Z est un coordinat polydentate de M

20 L est un groupe de liaison, tel que ureido,  
thioureido, un amide, tel que -CONH-, -CONMe- ; un  
thioether, tel que -S-, -S-S- ; un sulfonamide, tel que -  
SO<sub>2</sub>NH-, -SO<sub>2</sub>NMe ; L peut aussi contenir une chaîne  
moléculaire de composition et de longueur variable, qui est  
25 reliée à des coordinats polydentate Z par une partie des  
groupes bivalents précédemment mentionnés et à des  
substances Y par l'autre partie

Y est une substance fixée à Z par un ou plusieurs  
groupes de liaison L

30 n est un nombre entier égal ou plus grand que 1

p est un nombre entier égal ou plus grand que zéro

m est un nombre entier égal ou plus grand que zéro ;

3. Un procédé selon les revendications 1 et 2,  
35 caractérisé en ce que ladite partie est capable de se lier  
à un agent chimique.

4. Un procédé de liaison compétitif pour déterminer la présence d'un analyte d'intérêt dans lequel l'analyte et une partie chimique sont liés de façon compétitive à un matériau chimique, la partie chimique présentant la formule :  $(M - Z)_n - L_m - Y_p$

dans laquelle :

M est du terbium ou de l'euporium

Z est un coordinat polydentate de M.

10 L est un groupe de liaison, tel que un ureido, thioureido, un amide, tel que -CONH-, -CONMe- ; un thioether, tel que -S-, -S-S- ; un sulfonamide, tel que -SO<sub>2</sub>NH-, -SO<sub>2</sub>NMe ; L peut aussi contenir une chaîne moléculaire de composition et de longueur variable, qui est  
15 reliée à des coordinats polydentate Z par une partie des groupes bivalents précédemment mentionnés et à des substances Y par l'autre partie

Y est une substance fixée à Z par un ou plusieurs groupes de liaison L

20 n est un nombre entier égal ou plus grand que 1

p est un nombre entier égal ou plus grand que 1

m est un nombre entier égal ou plus grand que 1

le procédé consistant à :

25 a) mettre en contact le matériau, la partie chimique et l'analyte sous des conditions adéquates de façon à former un mélange réactif ;

b) amener la partie chimique à émettre de la lumière en appliquant une impulsion électrique à l'électrode immergée dans la solution ;

30 c) détecter la lumière émise après un certain temps de retard à partir de l'impulsion électrique et ainsi déterminer l'analyte d'intérêt.

5. Un procédé selon l'une quelconque des  
35 revendications 2, 3 ou 4, caractérisé en ce que Y est une cellule entière, une particule subcellulaire, un virus, un

acide nucléique, un polysaccharide, une protéine, un polypeptide, un enzyme, un métabolite cellulaire, une hormone, un agent pharmacologique, un médicament, un alcaloïde, un stéroïde, une vitamine, un acide aminé ou un hydrate de carbone.

6. Un procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que Y est un nucléotide, un oligonucléotide ou polynucléotide.

7. Un procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que Y est un anticorps.

8. Un procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit agent chimique est une cellule entière, une particule subcellulaire, un virus, un acide nucléique, un polysaccharide, une protéine, un polypeptide, un enzyme, un métabolite cellulaire, une hormone, un agent pharmacologique, une drogue, un alcaloïde, un stéroïde, une vitamine, un acide aminé ou un hydrate de carbone.

9. Un procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit agent chimique est immobilisé sur la surface d'au moins une des électrodes.

10. Un procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit agent chimique est un anticorps.

11. Un procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit analyte est une cellule entière, une particule subcellulaire, un virus, un acide nucléique, un polysaccharide, une protéine, un polypeptide, un enzyme, un métabolite cellulaire, une hormone, un agent pharmacologique, une drogue, un alcaloïde, un stéroïde, une vitamine, un acide aminé ou un hydrate de carbone.

12. Un procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit analyte est un anticorps.

13. Un procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit agent chimique est un anticorps.

14. Un procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit agent chimique est un anticorps spécifique de l'analyte immobilisé à la surface de l'électrode, Y est un anticorps contre un épitope différent ou identique de l'analyte, et l'analyte est fixé entre les anticorps, le procédé étant un essai non compétitif.

15. Un procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit analyte est une cellule entière, une particule subcellulaire, un virus, un acide nucléique, un polysaccharide, une protéine, un polypeptide, un enzyme, un métabolite cellulaire, une hormone, un agent pharmacologique, une drogue, un alcaloïde, un stéroïde, une vitamine, un acide aminé ou un hydrate de carbone.

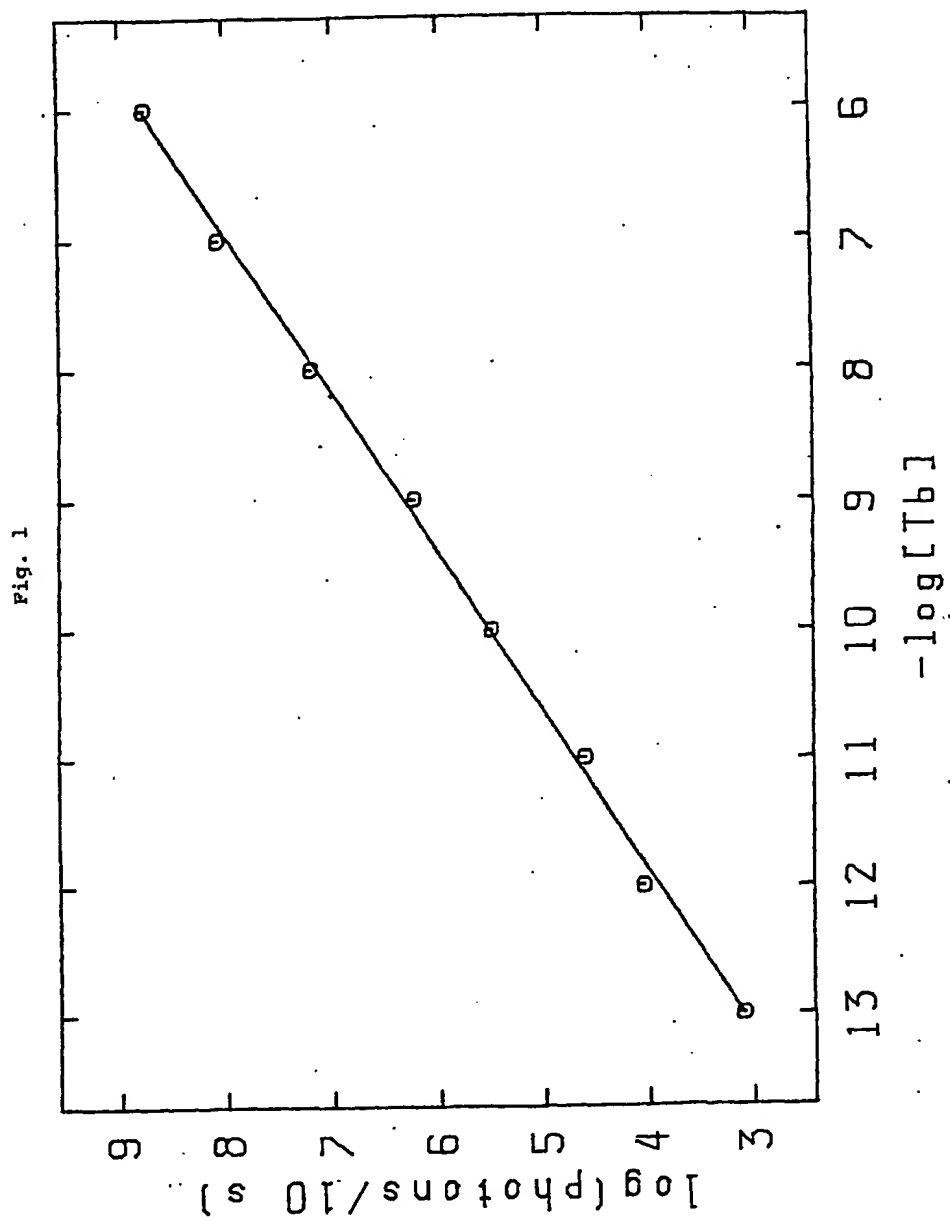
16. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 3, 4, 14 ou 15, caractérisé en ce que le procédé est un procédé homogène et en ce que les conditions adéquates sont telles que la partie chimique liée et la partie chimique non liée ne sont pas séparées avant que la lumière émise due aux impulsions électriques soit détectée.

17. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 3, 4, 14 ou 15 caractérisé en ce que le procédé est un procédé hétérogène et en ce que les conditions adéquates comprennent une séparation de la partie chimique liée et de la partie chimique non liée avant l'application des impulsions électriques à l'électrode et la mesure de la lumière émise.

2628838

20

18. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que au moins une des électrodes est en aluminium.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: SMALL TEXT

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**